Diss Berlyn 1960

I Püschman

Biochemische Untersuchungen an sensiblen und DDT-resistenten Stämmen von Drosophila melanogaster

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sigfrid Püschmann

aus Chemnitz

[1960]

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

304/60.

1. Referent: Prof. Dr. H. LÜERS

2. Referent: Prof. Dr. W. ULRICH

3. Referent: Prof. Dr. R. RIEMSCHNEIDER

Tag der mündl. Prüfung: 25. I. 1960

" " Promotion: 27. Juli 1960

Einleitung

Einen fermentativen Abbau von DDT wies REIFF (1955) bei der Stubenfliege Musca domestica mittels Biotest und chemisch-quantitativer Methode nach. DDT-resistente Fliegen bauten DDT stärker ab als DDT-sensible Tiere. REIFF nimmt an, daß DDT durch das Ferment Dehydrochlorinase in ein ungiftiges Äthylenderivat umgewandelt wird. Zu gleichen Resultaten kamen PERRY und HOSKINS (1950,1951) sowie BABERS und PRATT (1953) nach Stoffwechsel-analysen bei Musca. PERRY und HOSKINS untersuchten den Extrakt von Imagines, die 24 Stunden zuvor auf dem Thorax mit DDT begiftet worden waren. Ein colorimetrisches Verfahren nach SCHECHTER et al. (1945) ermöglichte ihnen, das DDT-Abbauprodukt DDE spektroskopisch nachzuweisen. Bei gleichem Nachweisverfahren untersuchten BABERS und PRATT Fliegen, die vorher außer auf dem Thorax auch durch Injektionen mit DDT-Aceton-Lösung begiftet worden waren. Im Gegensatz zu den genannten Autoren, die für DDT-resistente Individuen lediglich einen höheren DDT-DDE-Umsatz als für sensible angeben, halten STERNBURG, VINSON und KEARNS (1953) nur die resistenten Tiere befähigt, DDT in DDE umzuwandeln. Bei der Methodik, wie sie von PERRY und HOSKINS angegeben wurde, fanden sie nur im Extrakt DDT-resistenter Fliegen das ungiftige Äthylenderivat.

Aufgabe unserer Versuche war es, zu prüfen, ob bei der Taufliege Drosophila melanogaster ein fermentativer Abbau von DDT erfolgt, wie er für Musca nachgewiesen wurde. Diese Untersuchungen wurden sowohl an DDT-resistenten wie an DDT-sensiblen Stämmen vorgenommen. Danach sollte sich zeigen, ob bei Drosophila resistente bzw. auch sensible Fliegen befähigt sind, DDT abzubauen und ob ein quantitativer Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht. Wir wendeten dabei die chromatographische Methode wie REIFF an, ließen aber den Extrakt auch direkt auf DDT einwirken, um Auskunft über eventuelle Unterschiede im Wirkungsmechanismus der Fermente bei diesen verschiedenen Inkubationsverfahren zu bekommen.

In weiteren Experimenten wurde mit Hilfe der Papierelektrophorese versucht, tieferen Einblick in die Proteinzusammensetzung der Tiere unserer verwendeten Stämme zu gewinnen. Nach der Arbeit von REIFF muss den Proteinen eine große Bedeutung beim Ent-

giften von DDT beigemessen werden. Die Elektrophorese bietet allgemein eine bessere Möglichkeit der Auftrennung von Proteinen gegenüber der Chromatographie. So zeigten KRAMER und WITTMANN (1957) an verschiedenen Stämmen des Tabakmosaikvirus und WITSCHI (1959) an verschieden alten Rindern Unterschiede in Zahl und Lage der Proteinfraktionen mittels der Papierelektrophorese. Papierelektrophoretische Untersuchungen an Proteinen von Drosophila haben unseres Wissens bisher nur WUNDERLY und GLOOR (1953) vorgenommen. Die Auftrennung von Larvenserum verschiedener Mutanten ergab bei ihnen jeweils zwei Proteinfraktionen von unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit.
Zwecks Prüfung möglicherweise ungleichen Verhaltens der Proteine sensibler und resistenter Stämme betrachteten wir die Elpherogramme auf Fluoreszenz.

Material und Methodik

Für die Experimente wurden zwei DDT-sensible und sechs DDT-resistente Stämme von Drosophila melanogaster verwendet. Die DDT-sensiblen Stämme waren "Berlin wild" (S) [x] und "Park" (SP), beides Normalformen. Die resistenten Stämme waren aus diesen nach dem Verfahren des Überlebens einer für viele Individuen der gleichen Population letalen DDT-Einwirkung durch fortwährende Selektion gewonnen worden (BOCHNIG 1954, 1955 und unveröff.). Von dem "Berlin-wild"-Stamm, einem seit über 25 Jahren im Laboratorium gezüchteten Stamm, leiten sich die resistenten Selektionsstämme R I, R IIa, R II b, R II c und R II d ab, von dem "Park"-Stamm, einem kurz vor Beginn der Selektionsversuche in einem Berliner Parkgelände eingefangenen Freilandstamm, der Selektionsstamm RP. Die resistenten Stämme R I und R II (a, b, c, d) entstanden in zwei getrennten Selektionsversuchen. Bei der Zucht von R II fiel ein Teil der Fliegen nach einigen Generationen durch besonders hohe Überlebensraten auf. Diese Tiere wurden fortan als Stamm R II a, die anderen als R II b

---

x) Aus Gründen der Angleichung an die diesbezügliche Schreibweise in der internationalen Literatur erhalten die Stämme unseres Instituts gegenüber früheren Veröffentlichungen neue Symbole:
"Berlin wild" bisher K = Kontrolle: S = susceptible (sensibel)
"Park" bisher KP: SP
Resistenzstämme bisher S = Selektion: R = resistent

isoliert weitergezogen. Analog entstanden die Stämme R II c und R II d. Bei Übernahme des Materials von BOCHNIG im Dezember 1956 war über 195 Generationen (R I), 144 Generationen (R II a,b,c,d) und 175 Generationen (RP) selektioniert worden. Unterschiede im Grad der entwickelten Resistenz lassen sich in der Reihe R I < R II < RP darstellen, wobei, wie gesagt, der Resistenzgrad innerhalb der vier R II -Stämme ebenfalls Abweichungen aufweist. Zwischen den Stämmen "Berlin wild" und "Park" bestand ein geringer Sensibilitätsunterschied derart, daß letzterer etwas weniger empfindlich gegen DDT war.

Alle Versuche mit DDT der vorliegenden Arbeit wurden mit reinem kristallinen pp'-DDT (Schmelzpunkt = 107,5° C) vorgenommen, das auch für die Selektionszüchtung der Resistenzstämme verwendet worden war.

Zum Nachweis eines DDT-Abbaues dienten zwei Verfahren: der Biotest und die chemisch-quantitative Methode. Beiden Verfahren liegen Chromatogramme der Extrakte von Imagines zugrunde. Zur Gewinnung der Extrakte homogenisierten wir jeweils etwa 700 fünf Tage alte Fliegen (gewichtsmäßig 1 g) mit 2 cm^3 0,9 %iger NaCl-Lösung. Eine Zentrifuge vom Modell Ecco E II/11 trennte anschließend in drei Minuten bei 5000 U/min die Flüssigkeit des Extraktes von den Hartbestandteilen. Die Verwendung eines verdünnten Serums war unumgänglich, da die Ausbeute reinen Serums zu gering ist, um ein brauchbares Zentrifugat zu erhalten. Das gesamte Zentrifugat wurde mit einer Pipette auf Papier des Fabrikats SS 2043 b in einer Startlinie von 28 cm, also nicht wie üblich in Startpunkten, aufgetragen und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung als Lösungsmittel im aufsteigenden Verfahren etwa sechs Stunden chromatographiert. Während dieser Zeit lief das Lösungsmittel etwa 20 cm. Es entstanden so Chromatogramme von ca 600 cm^2.

Das Auftragen des Zentrifugats in einer Startlinie hat gegenüber dem von Startpunkten den Vorzug, daß nur eine, geometrisch exakt zu berechnende Proteinfläche entsteht. Fehlerquellen, die bei der Berechnung von mehreren, unregelmäßigen Proteinzonen, wie sie durch das Auftragen von Startpunkten entstehen, vorhanden sind, werden also ausgeschaltet.

Diese Chromatogramme wurden für fünfzehn Stunden bei 25° C zwischen zwei Glasplatten auf einen zweiten Bogen Filterpapier gebracht, der vorher mit einer DDT-Alkohollösung gleichmäßig besprüht worden war.

Für den Biotest betrug die versprühte DDT-Menge 1-4 mg auf

600 cm^2 Papierfläche. Unter "Biotest" versteht man in diesem Fall die Prüfung der DDT-Konzentration auf dem Papier durch die Reaktion (Stärke einer Krampfausbildung) der Fliegen, die mit dem Papier in Berührung gehalten werden. Die weitere Versuchsanordnung war folgende: Nach Trocknung der mit DDT besprühten und mit Chromatogrammen von Drosophilaserum inkubierten Papiere wurden auf diese Uhrschälchen von 3 cm Durchmesser fünf Tage alte Fliegen der DDT-sensiblen Stämme gebracht. Desgleichen wurden als Kontrollen DDT-sensible Fliegen auf DDT-Papier gebracht, die nicht mit Chromatogrammen sondern lediglich mit reinem Filterpapier inkubiert worden waren. Die Kontrollen sollen den Bezugspunkt für den tatsächlichen DDT-Abbau bilden; denn eine Verringerung von DDT-Substanz könnte auch durch Adsorption an die Papiere eintreten. Bei diesen Testungen verwendeten wir nur Männche Normales Verhalten und Stärke von Krampfausbildungen waren die Merkmale, auf die im Ergebnis geachtet wurde.

Die chemisch-quantitative Nachweismethode des DDT-Abbaues gründet sich auf eine Umwandlung von DDT in einen Farbstoff, dessen Lichtdurchlässigkeit in einem Photometer gemessen werden kann. Die Färbung ist umso intensiver, je mehr DDT zur Umwandlung zur Verfügung stand. Wir wendeten das von BAILES und PAYNE (1945) beschriebene Verfahren an. Bei dieser Nachweismehtode des DDT besprühten wir die Papiere mit 1 mg DDT im Lösungsmittel /600 cm^2. Die mit Chromatogrammen der Seren aller genannten Stämme von Drosophila inkubierten Papiere sowie die Papiere der Kontrollen, die wir in gleicher Weise wie die Kontrollen im Biotest gewonnen hatten, wurden nach Trocknung in Benzol ausgewaschen. Dies geschah zweckmäßig in einer Petrischale, nachdem die Papiere in entsprechend kleine Teile zerschnitten worden waren. Zur Auswertung benutzten wir das Photometer "Elektrophot I" der Firma Franz Bergmann KG.

Durch die dem Auswaschungsprozess anhaftenden Fehlerquellen (DDT-Benzol-Lösung verbleibt auf dem Papier) angeregt, eine zuverlässigere Methode zu finden, versuchten wir in weiteren Experimenten den Extrakt der Tiere im Reagenzglas direkt auf eine genau abgewogene Menge DDT, rein kristallin, einwirken zu lassen, das nach einer definierten Zeit mit Benzol herausgelöst und abzentrifugiert wurde. Dieses zusätzliche Verfahren sollte darüberhinaus, wie in der Einleitung angegeben, mögliche Unterschiede im Wirkungsmechanismus der Fermente bei Inkubation in verschiedenen Medien erkennen lassen. Der Weg erwies sich als

gangbar. Die für das BAILES-Verfahren störenden Augenfarbstoffe wurden vom Benzol nicht aufgenommen, so daß das abzentrifugierte Benzol glasklar blieb. Wir arbeiteten wiederum mit 1 mg DDT (kristallin) und fünfzehn Stunden Einwirkungszeit des Extraktes. Die Berücksichtigung etwaiger Adsorption von DDT, hier an die Extrakte, wurde in einem gleichen Prozess, wie eben beschrieben, kontrolliert mit der Abweichung, daß das DDT unmittelbar nach Einbringen in die Extrakte wieder herausgewaschen wurde. Diese Experimente erfuhren eine Erweiterung dadurch, daß wir sie mit einem Zusatz von Aktivkohle wiederholten. Die Oberflächenwirkung der Aktivkohle sollte eine Vergrößerung der Angriffsmöglichkeit der Extraktsubstanzen gegenüber DDT bewirken.

Für die elektrophoretischen Untersuchungen verlief die Serumbereitung aus Imagines nach dem gleichen Verfahren wie sie für die Versuche über den DDT-Abbau angegeben wurde. Außer den Imagines wurden auch Larven in die Versuche einbezogen. Erste Ergebnisse aus DDT-Sensibilitätsuntersuchungen an Larven der in vorliegender Arbeit verwendeten Drosophilastämme (äußerliche Kontaktwirkung auf Larven mit DDT-Substanz) durch PASTERNAK (unveröff.) lassen erkennen, daß die Larven unserer DDT-resistenter Stämme bei gleichen DDT-Dosen höhere Überlebensraten zeigen als die DDT-sensiblen Stämme. Da die Zusammensetzung des Serums während der larvalen Entwicklung stark schwankt, wurden zu seiner Gewinnung Larven gleichen Alters homogenisiert. Sie wurden innerhalb der kurzen Zeitspanne abgesammelt, während der sie zur Verpuppung den Futterbrei verlassen. Eine Verdünnung des Extraktes war hier nicht erforderlich. Als Elektrophoreseapparatur wurde das Gerät"Pheromat FB II", als Elektrophoresepapier die Sorte P 1005 verwendet. Der Puffer nach DITTMER (1956) hatte die Zusammensetzung: 7,36 g Veronal-Natrium, 3,86 g Natrium-Azetat auf 1 100 ccm Aqua bidest. und besaß einen pH von 9,0 und eine Ionenstärke von μ = 0,06. Die Menge des aufgetragenen Extraktes bewegte sich zwischen 0,015 ml bei verdünntem Zentrifugat der Imagines und 0,008 ml bei dem unverdünnten der Larven. Bei einer Laufzeit von fünfzehn Stunden ergab eine Stromstärke von 3 mA eine Spannung von 200 V je Probe die besten Elpherogramme. Nach Trocknung brachten wir die Elpherogramme zur Anfärbung der Proteine zehn Minuten in eine Amidoschwarzlösung von der Zusammensetzung:

100 ml Methanol
80 ml Aqua dest.
20 ml Eisessig
1 g Amidoschwarz 10 B.

Amidoschwarz 10 B hatte sich in vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen Proteinfärbemethoden bei EBERHARD (1956) als einziger Farbstoff erwiesen, der reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Entfernung des Farbstoffes aus den nicht proteinhaltigen Teilen der Papiere erfolgte oberflächlich in essigsaurem Wasser (2 ml Essigsäure auf 1 000 ml Aqua dest.) und anschließend gründlich in 100 ml Methanol, 80 ml Aqua dest., 20 ml Eisessig. Nach nochmaliger Trocknung der Streifen wurden die einzelnen Fraktionen durch Scherenschlag in den Farbminima auseinandergeschnitten und jeweils in 10 ml n/20 Natronlauge 30 Minuten eluiert. Als Leerversuch zur späteren Nullpunkteinstellung des Photometers diente ein den Fraktionen entsprechend großer Ausschnitt aus dem eiweissfreien Papier. Die Messung der Lichtdurchlässigkeit im Photometer wurde bei 570 mμ vorgenommen.

Vor dieser Aufarbeitung waren die noch ungefärbten Elpherogramme im UV-Licht der Wellenlänge 254 mμ mit der Pula-Lampe der Firma Marggraf Berlin und im Bereich von 366 mμ mit der Kofferanalysenlampe Mod. Q 81 - Pl 327 der Quarzlampen GmbH Hanau auf Fluoreszenz untersucht worden.

Versuchsergebnisse

I. Prüfung des fermentativen DDT-Abbaues

Zur Feststellung der R_F-Werte der chromatographierten Proteine war eine Anfärbung der Chromatogramme notwendig. Sie wurde nach der für Elpherogramme beschriebenen Methode vorgenommen. Die Proteine bedeckten eine zusammenhängende Zone zwischen den R_F-Werten 0,4 und 0,9. Die Anfärbung unterblieb bei den Chromatogrammen, die zum Nachweis des DDT-Abbaues verwendet wurden.

Der Biotest ist die weniger präzise der beiden genannten Nachweismethoden. Aus diesem Grunde vernachlässigten wir hier mögliche feinere Unterschiede im Abbauvermögen der verschiedenen resistenten Stämme. Bei den im Ergebnis zusammengefassten Versuchen stammte der Extrakt für die Inkubation mit den DDT-Papieren von allen resistenten Stämmen, wobei jeder einzelne Versuch mit einem

bestimmten Extrakt durchgeführt wurde. Die Testtiere nahmen wir sowohl vom Stamm "Berlin wild" als auch vom Stamm "Park". Tabelle 1 zeigt die Reaktion männlicher Imagines DDT-sensibler Stämme von Drosophila melanogaster auf DDT-imprägnierten Papieren mit verschiedenem DDT-Gehalt (mg/600 cm^2 Papierfläche).

Tabelle 1

Reaktion männlicher Imagines DDT-sensibler Stämme von Drosophila melanogaster auf DDT-imprägnierten Papieren. mit verschiedenem DDT-Gehalt (mg/600 cm^2 Papierfläche)

DDT-Einwirk.zeit in Std.	1 mg	2 mg	3 mg	4 mg
a) ohne voraufgegangene Inkubation mit Chromatogrammen von Drosophila melanogaster				
1	N	N	N	N
2	N	N	N	k
3	N	N	N	K
4	N	N	N-k	K
b) nach voraufgegangener Inkubation mit Chromatogrammen resistenter Stämme von Drosophila melanogaster				
1	N	N	N	N
2	N	N	N	N
3	N	N	N	k
4	N	N	N	k

N = normales Verhalten
k = leichte Krämpfe (Fortbewegung noch möglich)
K = Krampfzustand (keine Fortbewegung mehr, meist Rückenlage)

Jedes Einzelergebnis wurde an 45 Tieren gewonnen. Auf drei der 600 cm^2 großen DDT-Papiere ordneten wir je 15 Fliegen, jede unter einem Uhrschälchen von 3 cm Ø, in drei Reihen zu je fünf Individuen an.

Die deutlich schwächere Krampfausbildung bei den Tieren auf den Papieren nach voraufgegangener Inkubation mit Chromatogrammen der resistenten Stämme gegenüber den Befunden auf den Kontrollpapieren beweist eine Reduktion von DDT durch die Einwirkung der Proteine dieser Tiere.

Das Aufbringen auf verschiedene Abschnitte der Proteinzonen verursachte jedoch keinerlei unterschiedliches Verhalten der Tiere. Die Möglichkeit, daß nur bestimmte Bezirke des Protein-

chromatogrammes für den Abbau von DDT verantwortlich sein könnten, ließ sich aus diesen Ergebnissen daher nicht ableiten.

Zur Ermittlung des DDT-Abbauvermögens bei den einzelnen Stämmen wurde die chemisch-quantitative Methode für die verschiedenen Seren getrennt durchgeführt. Für die photometrische Auswertung war die Aufstellung einer Eichkurve für unser Photometergerät notwendig. Sie wurde an dem mit dem BAILES-Verfahren gewonnenen Farbstoff im Licht der Wellenlänge von 430 mμ vorgenommen, die die besten Absorptionsverhältnisse zeigte. Für den Wert D (Durchlässigkeit) ergab sich eine Streuung der Photometerangaben von ± 2 %. Das entspricht einer Streuung bezüglich der DDT-Reduktion von ± 5 %. Es hat sich gezeigt, daß bei einer größeren Anzahl von Messungen diese Angaben ausreichen, um mögliche Unterschiede im Abbauvermögen der verschiedenen Stämme nachzuweisen und fehlerkritisch zu sichern. Voraussetzung dafür ist aber die Anwendung der Sprühtechnik bei Aufbringung von DDT auf die Papiere. Ergebnisse in Vorversuchen mit DDT-Papieren, die in einer DDT-Alkohollösung getränkt waren, sind wegen ihrer großen Schwankungsbreite deshalb hier nicht aufgeführt, wenn sie auch sämtlich eine Farbstoffaufhellung nach Proteininkubation zeigten. (Wir verwendeten dabei nur Tiere DDT-resistenter Stämme.) Die Auswertung der Ergebnisse nach Inkubation von DDT mit Proteinextrakten auf Grund dieser chemisch-quantitativen Methode zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2

D-%-Angaben "Elektrophot": DDT-Umwandlung nach BAILES bei Inkubation mit Chromatogrammen von Proteinextrakten und Proteinextrakt (direkt) verschiedener Stämme von Drosophila melanogaster

Kontrollen	Berlin wild	Park	RI	RIIa	RIIb	RIIc	RIId	RP	Extr. R-Stämme	Extr. R-Stämme + A-Kohle
28,6	29,9	31,6	35,0	35,8	34,9	33,5	35,2	35,8	29,5	28,4
28,1	32,2	30,9	36,2	35,1	36,0	35,5	35,8	36,1	28,5	28,9
29,1	31,6	31,0	33,2	33,1	35,1	36,1	36,1	35,8	28,5	30,1
28,0	31,1		34,8	36,0	35,2		34,6	35,0	29,8	29,3
29,0	32,1		32,9	36,2			34,5	36,1	29,2	29,9
27,7	30,8		32,4	34,9			35,7	34,5	30,0	
28,9	31,9		35,9	35,0			33,9	35,1	29,0	
	30,0		36,2	33,8			36,1		29,1	
			35,1	35,2					29,2	
	entspricht einem mittleren DDT-Abbau von 12 %		entspricht einem mittleren DDT-Abbau von 25 %							

Die Anzahl der Messungen bei den Stämmen R II b und R II c wurde nicht erhöht, da aus den gewonnenen Werten ersichtlich war, daß sie mit denen der Stämme R II a und R II d übereinstimmen, die vorher untersucht worden waren. Auch zu den Befunden an den Stämmen R I und RP ist im Rahmen der oben erwähnten Schwankungsbreite kein Unterschied festzustellen.

Die Differenz der D-Prozentzahlen der Kontrollen einerseits und die der DDT-resistenten Stämme R I, R II a, b, c, d und RP andererseits entspricht einer mittleren Reduktion von 25 % DDT. (Über die statistische Sicherung der erhaltenen Werte s. u.) Nach der erwiesenen Abbaufähigkeit von DDT bei DDT-resistenten Stämmen wurden die Stämme "Berlin wild" und "Park" auf diese Eigenschaft hin untersucht (Tab. 2). Auch für die DDT-empfindlichen Stämme von Drosophila melanogaster ist danach ein Abbauvermögen gegenüber DDT festzustellen. Es ist jedoch geringer als bei den DDT-resistenten Stämmen. Der mittlere Abbau liegt bei 12 %. Bei fehlerkritischer Überprüfung der Differenz der beiden Versuchsreihen "Kontrollen" und "Berlin wild" mittels des

t-Verfahrens von STUDENT und PEARSON (1943) erhält man einen t-Wert von 6,75 oder P<0,0027, für die Differenz der Versuchsreihen "Kontrollen" zu Resistenzstämmen (zusammengefasst) ergibt sich t = 17,8 oder P<0,0027 und die Differenz der Versuchsreihen "Berlin wild" zu Resistenzstämmen ergibt t = 10,8 oder P<0,0027; das bedeutet sehr gute statistische Sicherung der ermittelten Unterschiede.
Nach diesen Untersuchungen sind wie bei Stubenfliegen für den Abbau von DDT Proteine oder an Proteine gebundene Substanzen verantwortlich.

Wie unter "Material und Methodik" angegeben, versuchten wir, einen DDT-Abbau mit Proteinextrakt direkt nachzuweisen. Wir prüften alle resistenten Stämme. Die Inkubation mit DDT erfolgte jeweils mit einem bestimmten Extrakt. Da außerhalb der gegebenen Schwankungsbreite keine Unterschiede zwischen den Stämmen zu erkennen waren, fassten wir die Resultate zusammen (Tab. 2). Die Angaben überraschen: Eine unmittelbare Einwirkung des Extraktes auf DDT reduziert dieses nicht. In der Annahme, daß Oberflächenwirkungen für diese unerwartete Reaktion verantwortlich sein könnten, wiederholten wir die Untersuchungen mit einer Beimischung von Aktivkohle. Es blieb jedoch bei gleichen Werten (Tab. 2).

II. Untersuchungen über die Proteinzusammensetzung

Die Untersuchungen mittels der Methode der Elektrophorese waren von einem günstigen Umstand begleitet: die im Proteinextrakt befindlichen Augenfarbstoffe der Fliegen wandern entgegengesetzt zu den uns interessierenden Proteinen. Die Augenfarbstoffe sind ohne Amidoschwarzfärbung zu erkennen. Die zur Erkennung der Proteine notwendige Anfärbung der Papiere verleiht jedoch auch den Farbstoff-Fraktionen das Aussehen von Proteinfraktionen. Dieser Faktor wäre bei gleichsinniger Ladung von Proteinen und Augenfarbstoffen sehr störend gewesen.
Neben der Frage nach Unterschieden zwischen Seren resistenter und sensibler Fliegen interessierte die Anzahl der bei Drosophila erkennbaren Proteinfraktionen, die von WUNDERLY und GLOOR (1953) mit 2 angegeben wurde. Im Laufe unserer Untersuchungen erhielten wir mehrere Elpherogramme, die deutlich 4 und eine weitere Fraktion unsicher erkennen lassen (Abb. 1).

Die prozentuale Eiweißverteilung für die einzelnen Fraktionen ist in Tab. 3 wiedergegeben. Bei der kolorimetrischen Berechnung wurde der Gesamteiweißgehalt des Elpherogramms gleich 100 gesetzt. Die Prozentzahlen ermittelten wir analog den Werten für den DDT-Abbau aus einer Eichkurve. Es handelt sich um Mittelwerte aus je fünf Messungen. Eine Dezimalkorrektur ergänzte auf 100 %.

Tabelle 3

Prozentuale Eiweißverteilung für die Fraktionen des Serums von Drosophila melanogaster

Fraktion	Proteinanteile in %
1	23,0
3	47,2
4	27,0
5	2,8

Zwischen den Fraktionen 1 und 3 glauben wir noch eine schwache Fraktion erkennen zu können.

Vergleiche der Elpherogramme von Seren resistenter und sensibler Stämme führten wir mit Imagines und Larven durch. Die Trennungsbilder der imaginalen Proteine waren bei allen Untersuchungen die gleichen (s. Abb. 1), unabhängig davon, ob resistente Stämme oder sensible zugrunde lagen. 44 Elpherogramme, auf denen jeweils ein bestimmtes Serum von Imagines aller genannten Stämme aufgetragen war, ließen keine Unterschiede erkennen; die Proteinfraktionen resistenter wie sensibler Stämme waren gleich in Zahl und Wanderungsgeschwindigkeit.

Die Proteine der Larven dieser verschiedenen Stämme von Drosophila melanogaster dagegen ergaben in ersten Versuchen unterschiedliche Trennbilder (Abb. 2). Die Larven wurden dabei am achten Tage nach der Eiablage aus dem Futterbrei abgesammelt. Den Larven der DDT-sensiblen wie der -resistenten Stämme stand also zu ihrer Entwicklung die gleiche Zeitdauer unter gleichen Entwicklungsbedingungen zur Verfügung.

Nach Ergebnissen von BOCHNIG (1955, 1959) an den gleichen Stämmen über entwicklungsphysiologische Unterschiede ist aber die larvale Entwicklung bei allen resistenten Stämmen gegenüber den sensiblen um etwa 24 Stunden verlängert. Daher sammelten wir in weiteren Versuchen die Larven nicht nach absoluter Zeit sondern

nach gleicher biologischer Reife ab. Zweckmäßig bot sich zum Absammeln die kurze Zeitspanne an, in welcher sie zur Verpuppung den Futterbrei verlassen. Tatsächlich führte diese Technik zu einem anderen elektrophoretischen Bilde. Die Seren von Larven DDT-resistenter und -sensibler Stämme ergaben nun gleiche Trennungsbilder sowohl untereinander als auch gegenüber denen von Imagines. Nach Betrachtung der Elpherogramme in Abb. 2 darf man schließen, daß bestimmte Proteinkomponenten erst kurz vor Beendigung der larvalen Entwicklung aufgebaut werden.

Ein Unterschied in der Auftrennung von Seren DDT-resistenter und -sensibler Stämme war nach diesen Experimenten auch bei Larven nicht festzustellen.

Vor Anfärbung der Elpherogramme beobachteten wir das Fluoreszenzverhalten im UV-Licht. Wir erhielten unter kurzwelliger Strahlung (254 mμ) keinerlei Fluoreszenz. Strahlung der Wellenlänge 366 mμ erzeugte Fluoreszenz. Nach Markierung der fluoreszierenden Stellen und Anfärbung der Elpherogramme zeigte sich jedoch, daß die fluoreszierenden Substanzen keine Proteine sein konnten; die Proteinfraktionen deckten sich nicht mit den Markierungen (Abb. 3).

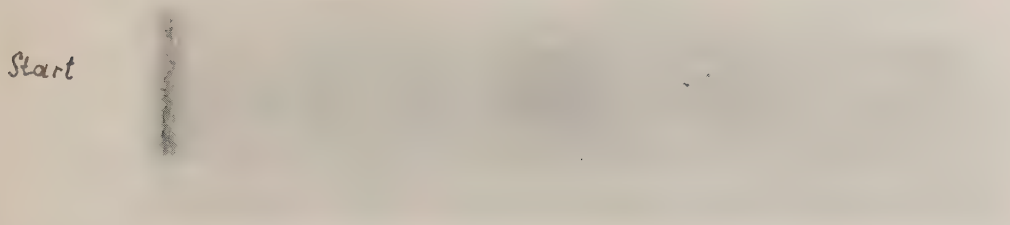

Abb. 1 Elpherogramm des Serums von Drosophila melanogaster (Imagines des Stammes "Berlin wild")

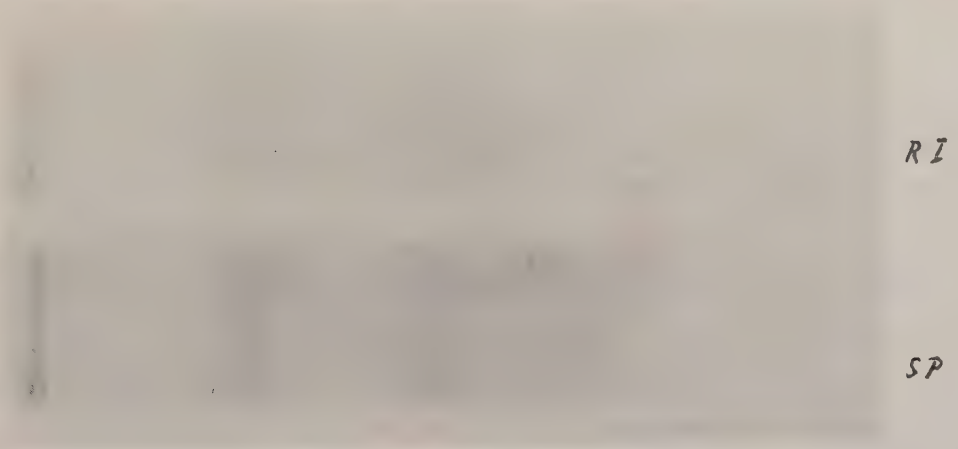

Abb. 2 Elpherogramme der Larven eines DDT-resistenten (R I) und DDT-sensiblen (SP) Stammes von Drosophila melanogaster bei gleicher larvaler Entwicklungsdauer

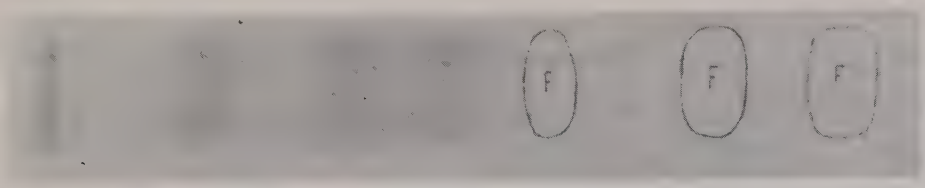

Abb. 3 Fluoreszenz auf Elpherogrammen von Drosophila melanogaster im UV-Licht von 366 mμ

Diskussion

Unsere Untersuchungen an DDT-resistenten und -sensiblen Stämmen von Drosophila melanogaster ergaben zwischen beiden Gruppen physiologische Unterschiede im Verhalten gegenüber der Einwirkung von DDT. Ein fermentativer Abbau von DDT wurde mittels der Papierchromatographie nachgewiesen; er war bei den DDT-resistenten Stämmen gesichert stärker, als bei den DDT-sensiblen Stämmen. Dabei ergaben verschiedene DDT-sensible Stämme einerseits und verschiedene DDT-resistente Stämme andererseits gleiche Ergebnisse. Die Reihe zunehmender Resistenz für unsere Stämme, wie sie BOCHNIG (1955) nach den Überlebensraten bei DDT-Begiftung bestimmte (S<SP<<R I<R II<RP), wiederholte sich bei diesen Beobachtungen nicht. Wir glauben aber, daß für die Feststellung von Differenzen des fermentativen DDT-Abbauvermögens innerhalb der sensiblen und resistenten Stämme unsere Nachweismethoden möglicherweise nicht ausreichten.

Für den Abbau von DDT erwies sich die gesamte Proteinzone in den Papierchromatogrammen, nicht einzelne Bezirke, verantwortlich. Die Auftrennung der Extrakte DDT-sensibler und -resistenter Stämme bei gleicher biologischer Reife der bearbeiteten Tiere in unseren elektrophoretischen Untersuchungen bestätigte das Ergebnis; die Trennbilder ließen keine Unterschiede erkennen. Diese Befunde und die daraus abgeleitete Annahme, daß die DDT-abbauenden Substanzen nicht an bestimmte Proteinfraktionen gebunden sind, wurden uns bei einer Aussprache mit R.WIESMANN auf Grund seiner eigenen unveröffentlichten Ergebnisse bestätigt. REIFF (1956) äußert nach Untersuchungen über den Gehalt an Aminosäuren in sensiblen und resistenten Musca-Stämmen ebenfalls die Vermutung, daß dem gesamten System der Proteine eine Aufgabe bei der Entgiftung von DDT zukommt. In den elektrophoretischen Untersuchungen ist es uns gelungen, das Serum von Drosophila in deutlich vier und eine weitere Fraktion unsicher aufzutrennen, das sind zwei bzw. drei Fraktionen mehr, als von WUNDERLY und GLOOR (1953) gefunden wurden. Da diese Autoren mit gleichem Puffer, also bei gleichem pH und gleicher Ionenstärke wie wir arbeiteten, könnten die Verwendung einer anderen Papiersorte oder Spannung (135 V) und Stromstärke (7 - 9 mA) die Elektrophorese in Bezug auf die Trennung der Proteine beeinflusst haben.[x)]

x) Nach Abschluß unserer Untersuchungen veröffentlichte CHEN (1959) Ergebnisse, wonach bei einer Elektrophorese auf Stärkegel 7 Eiweißfraktionen bei Drosophila nachzuweisen waren.

Ebenfalls durch papierelektrophoretische Untersuchungen konnten wir die Ergebnisse von BOCHNIG (1955 und 1959) über entwicklungsphysiologische Unterschiede zwischen DDT-resistenten und -sensiblen Stämmen von Drosophila bestätigen und erweitern.

Die fluoreszierenden Substanzen können aus unseren Betrachtungen ausgeschlossen werden. Da nach REIFF (1955), STERNBURG und Mitarbb. (1953), BABERS und PRATT (1953), PERRY und HOSKINS (1950) und nach den eigenen Versuchen Proteine für einen Abbau von DDT verantwortlich sind, darf gesagt werden, daß die DDT-abbauenden Stoffe keine Fluoreszenz hervorrufen. Unterschiede in den Fluoreszenzerscheinungen zwischen den Elpherogrammen resistenter und sensibler Stämme waren nicht festzustellen.

Die Tatsache, daß bei Inkubation von Extrakt der Imagines DDT-resistenter Stämme (direkt) mit DDT-Substanz kein Abbau von DDT erfolgte, wie er mittels der Papierchromatographie nachgewiesen wurde, könnte man mit der Annahme erklären, daß Hemmstoffe, die bei der Chromatographie des Extraktes zurückgehalten werden, die abbauende Substanz in ihrer Wirkung behindern. Nachdem unsere Arbeiten abgeschlossen waren, erfuhren wir von WIESMANN (unveröff.) daß er mit resistenten Stämmen von Musca ebenfalls nur einen DDT-Abbau mittels der Papierchromatographie erhalten konnte; bei Inkubation von Extrakt (direkt) mit DDT-Substanz erfolgte kein DDT-Abbau.
Bei einer Gegenüberstellung unserer Ergebnisse betreffend die Prüfung des fermentativen DDT-Abbaues an Drosophila melanogaster im Papierchromatogramm mit den REIFF'schen Ergebnissen an Stubenfliegen, sei kurz auf Material und Methoden bei REIFF eingegangen, soweit sie von den in dieser Arbeit beschriebenen abweichen. REIFF gibt die Bereitung seiner DDT-Papiere als "Imprägnierung" an. Wie WIESMANN mündlich mitteilte, besprühte REIFF (ein Mitarbeiter WIESMANNS) die Papiere nicht, sondern tauchte sie in DDT-Lösung und ließ sie abtropfen. Die verwendete DDT-Menge betrug für den Biotest und die chemisch-quantitative Methode 10 mg/100 cm^2. Der Biotest führte nach 1 1/2 Stunden Begiftung der Fliegen zu Krampf oder Rückenlage; bei Inkubation mit Serumchromatogrammen DDT-resistenter Fliegen blieben diese Symptome aus. Chemisch-quantitativ wies REIFF den DDT-Abbau mittels der SCHECHTER-HALLER-Methode nach. Es ergab sich ein DDT-Abbau durch resistente Musca-Stämme von 15 - 25 %.

Die DDT-Umwandlung zu einer nichtgiftigen Verbindung wurde als Dehydrochlorierung angegeben. Es entsteht so das Dichlordiphenyldichloräthylen (DDE).
Bei unseren Untersuchungen wichen wir in der Methodik von der REIFFs in der Konzentration der DDT-Papiere und im Verfahren des quantitativen DDT-Nachweises ab. Die grundsätzlichen Ergebnisse der REIFF'schen Arbeit und der eigenen Untersuchungen sind übereinstimmend; sowohl DDT-resistente Musca-Stämme wie DDT-resistente Stämme von Drosophila melanogaster sind befähigt, DDT fermentativ zu reduzieren, DDT-sensible Stämme bewirken einen DDT-Abbau in geringerem Maße. Den, trotz veränderter DDT-Konzentration der DDT-Papiere, etwa gleichen Prozentsatz des DDT-Abbaues wollen wir durch die folgenden Aussagen zu erklären suchen:

1. Nach den eigenen Erfahrungen auf Grund der vorliegenden Arbeit scheint eine genaue Angabe der DDT-Konzentration der DDT-Papiere bei Eintauchen der Papiere in DDT-Lösung sehr problematisch.

2. Die Papiere des Fabrikats SS 2043b, die wir gleich REIFF benutzten, werden in drei Ausgaben geliefert: "rauh", "nachgeglättet" und "maschinenglatt". REIFF machte keine Aussage, mit welcher Papiersorte er arbeitete. Da der Abbau des DDT ein Oberflächenprozess ist, dürfte die Sorte der verwendeten Papiere von Einfluß sein.

3. Wie WIESMANN halten auch wir bei diesen Untersuchungen einen verbindlichen Vergleich absoluter Zahlen verschiedener Autoren bezüglich des Prozentsatzes von reduziertem DDT für nicht möglich, da die äußeren Faktoren (Papieroberfläche, Aufbringen von DDT auf da Papier, Sorte der chromatographischen Papiere) einen starken Einfluß auf die chemische Reaktion haben, die zudem nur zu einem Teil abläu (Oberflächenreaktion).

Selbstverständlich bleibt auch die Möglichkeit offen, daß der DDT-Abbau bei Drosophila geringer ist als bei Musca.

Die Menge des DDT, die wir bei unseren Versuchen verwendeten, war so gering, daß sie von den Instrumenten gut gemessen werden konnte und den größtmöglichen messbaren Prozentsatz an abgebautem DDT erwarten ließ.
Nach dem erwiesenen fermentativen Abbau von DDT bei Musca durch REIFF und bei Drosophila durch eigene Versuche, scheinen die biologischen Wirkmechanismen, zumindest bei diesen Insektengattungen,

gleich zu sein. Auch PERRY und HOSKINS (1950, 1951), sowie BABERS und PRATT (1953) erhielten wie wir und entgegen STERNBURG und Mitarbb. (1953) einen geringen Abbau von DDT bei sensiblen Stämmen.
Bei derartigen Vergleichen ist jedoch Zurückhaltung geboten. Unterschiedliche biologische Wirkmechanismen bezüglich des DDT-Abbaues konnten nicht nur zwischen verschiedenen Insektenordnungen wahrscheinlich gemacht werden (KEARNS, 1955), sondern auch innerhalb einer Art (Musca domestica). So wiesen PERRY und HOSKINS (1950,1951), BABERS und PRATT (1953) sowie STERNBURG, KEARNS und BRUCE (1950) voneinander abweichende Abbaumechanismen nach. Es ergab sich ein DDT-DDE-Stoffwechsel bei resistenten und ein nicht identifizierbarer Stoffwechsel bei sensiblen Stämmen. Einen Abbau von DDT zu DDE und unbekannten Produkten bei resistenten Stämmen von Musca zeigten TAHORI und HOSKINS (1953), TERRIERE und SCHONBROD (1955), PERRY, JENSEN und PEARCE (1955) sowie BARKER (1957).

Versuche zum DDT-Abbau bei Drosophila liegen bisher nur von TSUKAMOTO (1958, 1959) vor. Nach Abschluß unserer Arbeiten gab er Ergebnisse bekannt, nach denen bei Stoffwechseluntersuchungen nach DDT-Behandlung bei resistenten Stämmen kein DDE sondern nur ein unbekanntes Abbauprodukt gefunden wurde. In seiner Arbeit von 1959 machte er genauere Angaben über diesen Stoff und beschreibt ihn in seinen Eigenschaften als dem Kelthan (1,1-bis(p-chlorophenyl)2,2,2-trichloro-äthanol) sehr nach stehend. Der Vergleich des Abbauprodukts mit Kelthan erfolgte papierchromatographisch. Damit gelang es TSUKAMOTO, einen neuen Weg im Chemismus des DDT-Abbaues aufzuzeigen. Nach Verabfolgung von DDE kann diese Substanz bei den Fliegen nicht nachgewiesen werden. Sie ist demzufolge kein Abbauprodukt von DDE bzw. kein Sekundärprodukt von DDT.
In vorliegender Arbeit wiesen wir einen erhöhten Abbau von DDT durch DDT-resistente Stämme von Drosophila melanogaster nach, wie er von verschiedenen Autoren an anderen Insektenordnungen ebenfalls erkannt wurde. Inwieweit das Vermögen, DDT zu reduzieren, für die Resistenz eines Insekts allein verantwortlich gemacht werden kann, muß jedoch offen bleiben. In Versuchen von WIESMANN (1959) erwiesen sich DDT-resistente Stubenfliegen gegenüber DDT auch nach Drosselung der normalen Abbaurate auf 2 - 3 % noch resistent. WIESMANN vertritt danach die Auffassung, daß der DDT-Abbau nur einen der verschiedenen simultan wirksamen Abwehr-

mechanismen der Insekten gegen die Begiftung darstellt. Auch LÜERS (1950, 1954), BABERS und PRATT (1953), REIFF (1955) und BROWN (1958) sehen in der Erscheinung der Resistenz eine kombinierte Abwehrleistung verschiedener Mechanismen. Allgemeingültig für die Erscheinung der Resistenz scheint ein verändertes morphologisch-physiologisches Verhalten gegenüber der Normalform zu sein, das durch genetische Faktoren bestimmt wird.

Zusammenfassung

1. Ein fermentativer Abbau von DDT konnte bei DDT-resistenten und abgeschwächt bei DDT-sensiblen Stämmen von Drosophila melanogaster mittels der Papierchromatographie nachgewiesen werden. Unterschiedliches Verhalten im Abbauvermögen innerhalb der Gruppen der verwendeten sensiblen und resistenten Stämme war nicht festzustellen.
2. Bei direkter Einwirkung von Proteinextrakt oder von Proteinextrakt mit Aktivkohle auf DDT zeigte sich kein Abbau.
3. Das Serum von Drosophila melanogaster konnte mittels Papierelektrophorese in deutlich vier und eine weitere Proteinfraktion unsicher aufgetrennt werden.
4. Die Trennungsbilder der Seren von Larven DDT-resistenter und -sensibler Stämme gleichen Entwicklungsalters waren unterschiedlich.
   Die Trennungsbilder der Seren von Larven DDT-resistenter und -sensibler Stämme gleicher biologischer Reife waren nicht unterschiedlich.
   Die Trennungsbilder der Seren von Imagines DDT-resistenter und -sensibler Stämme waren nicht unterschiedlich.
5. Die Proteine zeigten keine Fluoreszenz im UV-Licht.

Literatur

BABERS, F. H., and J. J. PRATT jr.: Resistance of insects to insecticides: the metabolism of injected DDT. J. econ. Ent. 46, 997-982 (1953).

BAILES, E. L., and M. G. PAYNE: Colorimetric method for determination of DDT.

BARKER, R. J.: The absorption and degradation of DDT at varied dosages by the housefly. J. econ. Ent. 50, 748-750 (1957)

BOCHNIG, V.: Genetische Untersuchungen zur DDT-Resistenz an Drosophila melanogaster. Z. Vererbungsl. 86, 185-209 (1954).

: Über den O_2-Verbrauch eines DDT-sensiblen und eines resistenten Stammes von Drosophila melanogaster. Z. Naturforsch. 10b, 409-412 (1955).

: Über die genetischen Grundlagen der Insektizid-resistenz bei Fliegen. Z. angew. Zool. 46 392-397 (1959).

BROWN, A. W. A.: The insecticide-resistance problem. Bull. WHO 18, 309-321 (1958)

CHEN, P. S. : Trennung der Blutproteine von Drosophila und Culex-Larven mittels Stärkegel-Elektrophorese. Rev. Suisse Zool. 66, 280-289 (1959).

DITTMER, A.: Papierelektrophorese. Gustav Fischer, Jena (1956)

EBERHARD, H.: Untersuchungen über die Bindung von Farbstoffen an Proteine auf Filtrierpapier und ihre Bedeutung für die Auswertung von Papierelektropherogrammen. Röntgen- u. Labor-Praxis 9, 249-261, 283-295 (1956).

KEARNS, C. W.: The enzymatic detoxication of DDT. In: Origins of Resistance to Toxic Agents. Acad. Press Inc., Publ., New York (1955).

KRAMER, E. und H.-G. WITTMANN: Elektrophoretische Untersuchungen der A-Proteine dreier Tabakmosaikvirus-Stämme. Z. Naturforsch. 13b,30-33 (1958).

LÜERS, H.: Über genetische Versuche mit Kontaktinsektiziden an Dorsophila. Moderne Biologie. Festschrift zum 60. Geburtstag von Hans Nachtsheim. Berlin 1950

: Das Resistenzproblem in der Insektizidanwendung.

In: Wd. Eichler: Insektizide heutzutage. Verlag Volk und Gesundheit. Berlin 1954.

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine neue t-Tafel).
Biol. Zbl. 63, 152-168 (1943).

PERRY, A. S., and W. M. HOSKINS: The detoxification of DDT by resistant house flies and inhibition of this process by Piperonyl cyclonene.
Science 111, 600-601 (1950).
: Detoxification of DDT as a factor in the resistance of house flies.
J. econ. Ent. 44, 850-857 (1951).

PERRY, A. S., J. A. JENSON, and G. W. PEARCE: Colorimetric and radiometric determination of DDT and its metabolits in resistant house flies.
WHO 6, 3 (1955).

REIFF, M.: Nachweis des fermantativen Abbaus der DDT-Wirksubstanz mit Fliegenextrakten im Papierchromatogramm.
Rev. Suisse Zool. 62, 218-224 (1955).
: Untersuchungen des Amirosäuregehaltes der Hämolymphe bei Imagines von verschiedenen Musca domestica - Stämmen.
Verh. schweiz. naturforsch. Ges. 56, 133-134 (1956)

SCHECHTER, M. S., S. B. SOLOWAY, R. A. HAYES, and H. L. HALLER: Colorimetric determination of DDT.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 704-709 (1945).

STERNBURG, J., C. W. KEARNS, and W. N. BRUCE: Absorption of metabolism of DDT by resistant and susceptible house flies.
J. econ. Ent. 43, 214-219 (1950).

STERNBURG, J., E. B. VINSON, and C. W. KEARNS: Enzymatic dehydrochlorination of DDT by resistant flies.
J. econ. Ent. 46, 513-515 (1953).

TAHORI, A. S., and W. M. HOSKINS: The absorption, distribution, and metabolism of DDT in DDT-resistant house-flies.
J. econ. Ent. 46,829-837 (1953).

TERRIERE, L. C., and R. D. SCHONBROD: The excretion of a radioactive metabolite by house flies treated with carbon 14 labelled DDT.
J. econ. Ent. 48, 736-789 (1955).

TSUKAMOTO, M.: DDT metabolism in D. melanogaster.
Dros. Inform. Serv. 32,162 (1958).

TSUKAMOTO, M.: A new metabolic fate of DDT found in Drosophila. WHO 18, 7 (1959).

WIESMANN, R.: Unterschiede in der Physiologie normaler und resistenter Stubenfliegen. Z. angew. Zool. 46, 386-391 (1959).

WITSCHI, A: Papierelektrophoretische Untersuchungen über die quantitativen Verhältnisse der Serumeiweissfraktionen beim gesunden Rind vom 1. - 360. Tag unter besonderer Berücksichtigung der methodisch bedingten Variabilität. Z. Tierzüchtg. 72, 302-329 (1959).

WUNDERLY, Ch. und H. GLOOR: Versuche zur Charakterisierung der larvalen Blutproteine normaler und letaler Genotypen von Drosophila mittels Papier-Elektrophorese. Protoplasma 42, 273-282 (1953).

Lebenslauf

Am 8. 3. 1933 wurde ich in Chemnitz geboren. Meine Eltern sind der Verwaltungsbeamte Herbert Bernhard Püschmann und dessen Ehefrau Ilse Gertrud geb. Böttrich, beide wohnhaft in Neukirchen/Erzgeb.

Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Grundschule in Neukirchen, und vom Herbst 1943 bis 1951 die Oberschule (Friedrich-Engels-Schule) Chemnitz im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Zweig. An letzterer legte ich am 18. 6. 1951 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1951/52 wurde ich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Am 21. 7. 1956 bestand ich das Staatsexamen vor dem Wissenschaftlichen Prüfungsausschuss Berlin.

Meine Lehrer waren die Herren Professoren DRAWERT, GÜNTHER, HERTER, LÜERS, NACHTSHEIM, ULRICH in Biologie, LAUTSCH und LORENZ in Chemie.